Identifizierung positiver Klone aus einer λ-Phagenbibliothek

Betreuer: Elke Muth-Köhne und Nora Cavara

Beginn des Versuchs: 9.00 Uhr im Praktikumssaal NBCF 04 Nord

1. Theoretischer Hintergrund

1.1 Screening von Genbibliotheken

Eine häufig angewandte Methode zur Identifizierung von Genen in einem Organismus ist die Durchmusterung (*Screening*) von Genbibliotheken.

Eine Genbibliothek umfasst im Allgemeinen das gesamte Genom eines bestimmten Organismus' oder Gewebes, welches in Form von definierten DNA-Fragmenten in einen einzelligen Träger eingebracht wurde. Bei der in diesem Versuch verwendeten Genbibliothek handelt es sich um eine cDNA-Bibliothek, die nach reverser Transkription aus RNA der Kaulquappe des südafrikanischen Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) gewonnen wurde und in den Bakteriophagen Lambda einkloniert wurde.

Durchmustert wird die Bibliothek in diesem Versuch nach der cDNA für eine Untereinheit eines Neurotransmitter-Rezeptors (*Xen*NR1).

Frage: Warum wird eine cDNA-Bibliothek verwendet? Warum wird nicht genomische DNA eingesetzt? (Mindestens 2 Gründe.)

Die Phagen, welche die fragmentierte cDNA aus der Kaulquappe beinhalten, können benutzt werden, um Bakterien zu infizieren. In diesem Versuch werden *E.coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue eingesetzt. Die Phagen nutzen zur Infektion dieser Bakterien das bakterielle Maltosetransportsystem. Um die Expression der Maltoserezeptoren zu gewährleisten, werden die Bakterien in Maltose-haltigen Medien kultiviert.

Nach der Infektion mit der Phagenbibliothek werden die Bakterien auf Agar-Platten inkubiert. Bei erfolgreicher Infektion kommt es zur Lyse der Bakterien, und es entstehen sog. Plaques. Bakterien- und Phagenmenge werden so gewählt, dass eine gewünschte Anzahl an Plaques entsteht. Die Plaques, die als kreisrunde Löcher im ansonsten dichten Bakterienrasen sichtbar sind, enthalten neben den lysierten Bakterien auch die Phagen. Durch Auflegen einer Nylonmembran adhärieren diese Phagen an die Membran. Nach alkalischer Denaturierung

der Phagenhülle und der DNA kann die Phagen-DNA (und somit das einklonierte Fragment als Teil der Bibliothek) kovalent an die Membran gebunden werden. Dies geschieht entweder durch längere Hitzeeinwirkung oder Bestrahlung mit UV-Licht (*UV-crosslinking*). Anschließend folgt eine Vorhybridisierung, die dafür sorgt, dass bei der eigentlichen Hybridisierungsreaktion die unspezifische Bindung minimiert wird. Das wird durch den Zusatz von Lachssperma-DNA erreicht, die an die noch freien Stellen der Membran bindet.
Die Hybridisierung kann unter hoch- oder niederstringenten Bedingungen durchgeführt werden. Bei hochstringenten Bedingungen wird eine hohe Hybridisierungstemperatur wie 65°C verwendet. So wird sichergestellt, daß nur stark homologe Sonden- und Phagen-DNAs (> 90% Sequenzidentität) hybridisieren. Auf diese Weise kann sehr spezifisch nach einem Gen oder einer cDNA gesucht werden. Bei niederstringenten Bedingungen werden dagegen niedrigere Hybridisierungstemperaturen (z.B. 42°C) und aprotische Lösungsmittel wie Formamid gewählt, was letztlich auch eine Hybridisierung von DNAs mit geringerer Homologie (ab ca. 70% Sequenzidentität) zuläßt.
Bei der Hybridisierung wird mittels einer Sonde (siehe 1.2) detektiert, ob das gewünschte DNA-Fragment in einem der Plaques vorhanden ist (Prinzip der Detektion siehe 1.3). Ist dies der Fall, kann das gewünschte DNA-Fragment durch eine *in vivo*-Exzision aus den Phagen isoliert werden. Dazu werden spezifisch die Phagen des positiv identifizierten Plaques (mit dem einen gewünschten cDNA-Fragment) verwendet, um neue Bakterien zu infizieren. Gleichzeitig wird ein Helferphage eingesetzt, der die *in vivo*-Exzision des cDNA-Inserts vermittelt. Die cDNA kann anschließend durch eine Plasmidpräparation (alkalische Lyse) aus den Bakterien isoliert und für einen Kontrollverdau mit Restriktionsendonukleasen verwendet werden.

1.2 Herstellen der Sonde

Als Sonde wird ein speziell markiertes Fragment der gesuchten cDNA eingesetzt. Dazu wird ein Teilstück bekannter Sequenz des gesuchten Klons für ein sog. *random primed labeling* eingesetzt. Für diese Methode werden die zu markierenden DNA-Fragmente zunächst denaturiert und mit einem Hexanukleotid-Gemisch (*random primer*) versetzt. Beim Abkühlen der Probe hybridisieren die Hexanukleotide mit den einzelsträngigen DNA-Fragmenten. Durch Zugabe des Klenow-Fragments werden diese Stränge mit Nukleotiden aufgefüllt.

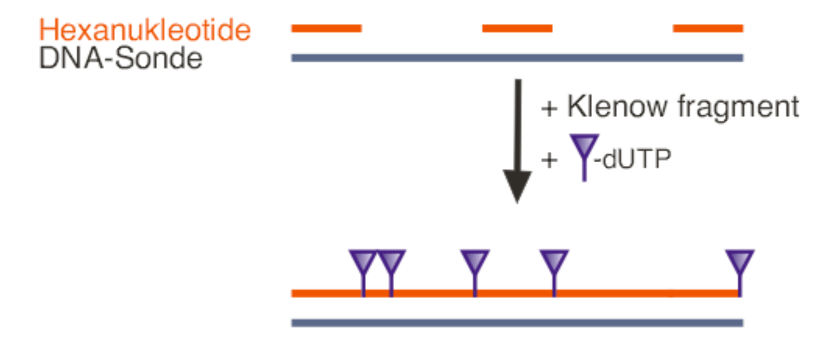


Abb.1 Prinzip der Sondenmarkierung mit DIG-markierten dUTP.

Frage: Worum handelt es sich beim Klenow-Fragment? Welche katalytischen Eigenschaften besitzt dieses Protein?

Die Nukleotide, welche der Reaktion zugesetzt werden, enthalten eine spezifische Markierung (in Abb. 1 als Dreieck dagestellt), die radioaktiv sein kann, oder z.B. ein Epitop für einen Antikörper darstellt. In diesem Versuch wird das Reagenz DIG-High Prime zur Markierung verwendet, welches alle benötigten Komponenten (einschließlich des Klenow-Enzyms) enthält. Die dUTP-Nukleotide sind Digoxigenin-markiert.

.

Abb. 2 Struktur von DIG-11-UTP

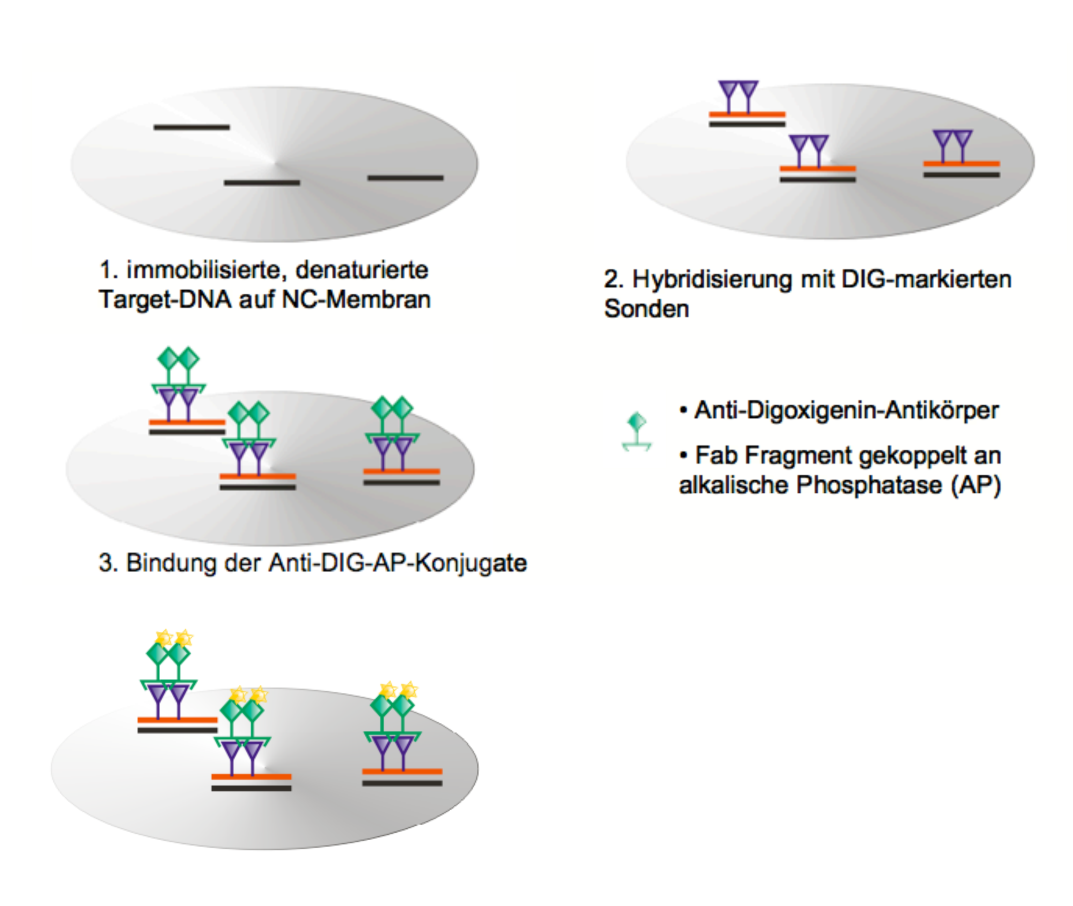
Bei Digoxigenin (DIG) handelt es sich um ein Steroid-Hapten, also einen Stoff, der nach Bindung an ein Trägermolekül als Antigen erkannt werden kann. Der Herstellung der Sonde schließt sich eine Aufreinigung mittels einer Gelfiltration an.

Frage: Warum ist an dieser Stelle eine Gelfiltration notwendig? Was ist das Prinzip der Gelfiltration?

1.3 Prinzip der Detektion

Nach der Hybridisierung der Sonden mit der an die Nylonmembran gebundenen Phagen-DNA erfolgt die Detektion positiver Plaques über eine Chemolumineszenz-Reaktion. Dazu wird ein Anti-DIG-Antikörper eingesetzt, der überall da binden kann, wo DIG-markierte Sonden an Phagen-DNA gebunden haben – also in den Plaques, die mit einem Phagen infiziert wurden, der die gesuchte cDNA enthielt.

Der Anti-DIG-Antikörper ist seinerseits an das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt, das eine Chemolumineszenz-Reaktion katalysiert.



4. Chemolumineszenz-Reaktion

Abb. 3 Prinzip der Detektion.

Wird auf die Nylonmembran ein spezielles Lumineszenz-Reagenz (CSPD) gegeben, katalysiert die alkalische Phosphatase die Abspaltung eines Phosphatrests. Das metastabile Zwischenprodukt zerfällt anschließend unter Aussendung eines Lichtquants – dies kann durch das Auflegen eines Films als lokale Schwärzung detektiert werden.

Abb. 4 Chemolumineszenz-Reaktion

1.4 Kontrollrestriktion der isolierten cDNA

Restriktionsendonukleasen, auch Restriktionsenzyme genannt, sind Enzyme, die zum Restriktions- und Modifikationssystem gehören, mit dem sich Mikroorganismen (vorwiegend Bakterien) gegen fremde DNA schützen. Alle Restriktionsenzyme, von denen verschiedene Typen beschrieben sind, schneiden Doppelstrang-DNA, indem sie die Phosphodiester-bindungen des Phosphatrückgrats hydrolytisch spalten. Bei den Typ II-Restriktionsendonukleasen liegt die spezifische Schnittstelle innerhalb der Erkennungssequenz, weshalb dieser Typ für die molekularbiologische Anwendung von großer Bedeutung ist. Je nach Restriktionsenzym entstehen dabei glatte Schnittstellen (*blunt ends*) oder kurze kohäsive Einzelstrangenden (*sticky ends*). Durch die Restriktion entstehen Fragmente definierter Länge, die gelelektrophoretisch aufgetrennt werden können. In diesem Versuch wird die Genbibliothek nach der cDNA eines Neurotransmitter-Rezeptorproteins durchsucht. In der Restriktionsanalyse wird das Bandenmuster isolierter cDNA aus potentiell positiven und negativen Plaques mit einer Kontroll-cDNA verglichen. Auf diese Weise ist es möglich, den Erfolg des *Screenings* und der Isolierung schnell und einfach zu überprüfen.

2. Praktischer Teil

2.1 Zeitlicher Ablauf

Tag eins

- Herstellung von Filterabzügen auf Nylonmembranen von einer ausplattierten λ-Phagen-Bibliothek
- Vorhybridisierung der Nylonmembranen
- Gelfiltration der DIG-markierten DNA-Sonde
- Hybridisierung der Nylonmembranen mit der DIG-markierten DNA-Sonde
- Herstellung einer DIG-markierten Sonde
- Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten nach *in vivo*-Exzision von positiven und negativen Plaques

Tag zwei

- Detektion positiver Plaques
  - Waschen der Nylonmembranen
  - Herstellung der Inkubationslösungen
  - Detektion mithilfe des DIG-Lumineszens-Detektionskits
- Ausplattieren der cDNA-Bibliothek
- Agarosegel der Kontrollrestriktion

2.2 Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte

2.2.1 Ausplattieren einer cDNA-Bibliothek

Bakteriophagen gelangen über das Maltosetransportsystem von E. coli XL-1 blue MRF’ in die Bakterien. Maltoserezeptoren werden allerdings nur in Gegenwart von Maltose exprimiert. Deshalb muss dem Medium bei der Kultivierung Maltose zugefügt werden. Die Bakterien werden bis zu einer OD von 0,5 herangezogen und anschließend in 10 mM MgSO4 kultiviert.

Materialien

- NZY-Top-Agarplatten (∅ 15 cm)
- NZY-Top-Agarose
- Bakterienkultur
- Bakteriophagen-cDNA-Bibliothek

Durchführung

- NZY-Top-Agarose aufkochen und bei 65°C aufbewahren
- Je Platte 8 ml Agarose in ein Reagenzglas füllen, ebenfalls bei 65°C aufbewahren
- Je Platte 500 µl Bakterienkultur mit soviel Phagen inkubieren, dass ca. 100, 200 und 500 Plaques auf den Platten sind (genaue Konzentration wird während des Versuchstages angegeben)
- 10 min bei 37°C inkubieren
- Agarose mit den infizierten Bakterien animpfen und auf den Platten ausplattieren
- Über Nacht bei 37°C inkubieren

2.2.2 Herstellung und Gelfiltration der DIG-markierten DNA-Sonde

Um positive Plaques zu identifizieren, muss eine homologe DNA-Sonde hergestellt werden. Die Sonde muss in irgendeiner Form markiert sein, um später homologe DNA anzeigen zu können. Zu diesem Zweck wird in diesem Versuch DIG High Prime (Roche) verwendet. In diesem Kit sind alle Reagenzien vorhanden, die für eine Markierung der Sonde benötigt werden. Die DNA-Fragmente müssen zunächst denaturiert werden. Anschließend werden sie mit einem Hexanukleotid-Gemisch inkubiert, mit dem sie Doppelstränge ausbilden. Durch Zugabe des Klenow-Fragment und DIG-markierten dUTP können diese Doppelstränge aufgefüllt und markiert werden. Um die markierten Sonden von freien Nukleotiden und den Primern zu befreien, werden die Sonden mittels Gelfiltration aufgereinigt.

Materialien

- DIG High Prime (Roche Applied Science)
- Template-DNA
- 0,2 M EDTA
- Nap10-Säulen
- 1x TE

Durchführung

- 100-200 ng DNA mit ddH2O auf ein Volumen von 16 µl auffüllen
- DNA im Wasserbad 10 min denaturieren und schnell auf Eis abkühlen
- DIG High Prime gündlich mischen und 4 µl zu der denaturierten DNA geben; kurz mischen und über Nacht bei 37°C inkubieren
- Die Reaktion durch zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA abstoppen
- Nap10 Säule mit 10 ml 1xTE äquilibrieren
- Sonde auf 1 ml mit 1xTE auffüllen
- Sonde auf die Säule pipettieren, Durchfluss verwerfen
- 1 ml 1xTE auf die Säule geben, Durchfluss auffangen

2.2.3 Herstellung von Filterabzügen und anschließende Detektion

Die Phagen werden auf Nylonmembranen übertragen. Die Denaturierung der Phagen und deren DNA erfolgt durch alkalische Behandlung. Die kovalente Bindung der DNA an die Membran erfolgt entweder mittels längerer Hitzeeinwirkung oder durch UV-*crosslinking*. Anschließend werden die Membranen vorhybridisiert, um unspezifische Bindungen der eigentlichen Hybridisierungsreaktion zu minimieren. Dazu werden die Membranen mit Lachssperma-DNA inkubiert, die an freie Stellen auf der Membran bindet. Die Hybridisierung erfolgt unter stringenten Bedingungen, so dass die Sonde nur an hoch-homolge Bereiche binden kann und spezifisch nur ein Gen detektiert wird. Nach der Hybridisierung müssen die Membranen stringent gewaschen werden, um ungebundene Sonden zu entfernen. Für die Detektion und Identifizierung der positiven Plaques wird das DIG Luminescense Detektion Kit (Roche) verwendet. Sie beruht auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen zwischen den DIG-markierten dUTPs und einem gegen das DIG gerichtetem Antikörper. Anschließend erfolgt eine Lumineszenz-Reaktion, bei der CSPD von der an den Antikörper kovalent gebundenen alkalischen Phosphatase unter Freisetzung eines Lichtquants umgesetzt wird. Diese Reaktion kann auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

Materialien

- Denaturierungspuffer
    - 0,5 M NaOH
    - 1,5 M NaCl
- Renaturierungspuffer
    - 0,5 M Tris/HCl
    - 1,5 M NaCl
- Vorhybridisierungslösung
    - 5x SET
    - 0,1 % SDS
    - 5x Denhardts-Lsg.
    - 100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA
- Hybridisierungslösung
    - Vorhybridisierungslösung
    - DNA-Sonde
- Waschpuffer (stringentes Waschen)
    - 2x SET
    - 0,1 % SDS
- Waschpuffer (Detektion)
    - Maleinsäurepuffer (pH=7,5)
        - 0,1 M Maleinsäure; mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
        - 0,15 M NaCl
    - 0,3% (v/v) Tween 20
- DIG Luminescence Detection Kit
    - Blockierungslösung
        - 1% Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer (pH=7,5)
        - in Mikrowelle kochen
    - Antikörperlösung (1:10000 in Blockierungslösung)
    - Detektionspuffer
        - 0,1 M Tris/HCl (pH=9,5)
        - 0,1 M NaCl
    - CSPD-Lösung
        - CSPD-Lösung 1:100 in Detektionspuffer verdünnen

Durchführung

- Nylonmembran auf die Agar-Platten legen und markieren
- Phagen-DNA denaturieren und neutralisieren;
    - Denaturierung: die Membranen auf mit Denaturierungspuffer getränktes Whatman-Papier legen; Phagenseite nach oben
    - Neutralisation: die Membranen auf mit Natralisierungspuffer getränktes Whatman-Papier legen; Phagenseite nach oben
- DNA kovalent auf den Nylonmembranen verlinken (UV-Crosslinker)
- Vorhybridisierung für 2-3 h bei 65°C (100 ml)
- Hybridisierung über Nacht bei 65°C (20 ml)
- Am nächsten Tag Membranen 2x30 min stringent waschen (je 100 ml)
- 5 min in Waschpuffer (Detektion) waschen (100 ml)
- 30 min blockieren in Blockierungslösung (100 ml)
- 30 min inkubieren in Antikörperlösung (20 ml)
- 2x 15 min waschen (je 100 ml)

- 5 min äquilibrieren in Detektionspuffer (20 ml)
- je 1 ml CSPD-Lösung auf die Membranen tropfen und in Frischhaltefolie einwickeln
- 5 min bei RT inkubieren
- 15 min bei 37°C inkubieren
- 30 min Röntgenfilm auflegen und anschließend Film entwickeln

2.2.4 Kontrollrestriktion

Nach einer erfolgten *in vivo*-Exzision können Klone auf ihre richtige Sequenz kontrolliert werden. Dazu wird die DNA mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten, so dass sich bei einer korrekten Sequenz das erwartete Bandenmuster auf einem Agarosegel detektieren lässt. Dazu muss die DNA zunächst mit den Restriktionsenzymen inkubiert werden. Anschließend wird die geschnittene DNA mit Probenpuffer versetzt und je nach Größe der DNA auf ein 1-2%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen. Nach Anlegung der Spannung wandern die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung zum Plus-Pol.

Materialien

- DNA
- Restriktionsenzyme
- Restriktionspuffer (10x)
- BSA (10x)
- Probenpuffer (6x)
- Agarose
- 1x TBE
- Ethidiumbromid

Durchführung

- Restriktionsansatz herstellen
    - 1 µg DNA
    - 1 µl Puffer (10x)
    - 1 µl BSA
    - x µl Restriktionsenzym (berechnen!)
    - ad ddH2O auf 10 µl
- für 2 h bei 37°C inkubieren
- Restriktionsansatz über Nacht bei -20°C einfrieren
- Ansatz mit 6x Probenpuffer versetzen
- Agarosegel gießen, dazu Agarose in entsprechender Menge 1x TBE aufkochen und mit Ethidiumbromid versetzen (1:10.000)
- In Gelschlitten gießen und entsprechenden Kamm einsetzen
- Gel 45 min bei 100 mV laufen lassen
- Restriktion an der Gel-Dokumentationsanlage überprüfen